

AN 1991-041816 [06] WPIDS Full-text  
DNN N1991-032163 DNC C1991-018195  
TI Identifying genotype of triticeae perennial wheat grain -  
by electrophoresis, involves preparing prolamine extract from  
isolated endosperm, to increase accuracy.  
DC A89 C03 P13  
IN AGAFONOV, A V; AGAFONOVA, O V  
PA (ASIB-R) AS SIBE BOTANICAL  
CYC 1  
PI SU 1546022 A 19900228 (199106)\*  
ADT SU 1546022 A SU 1987-4346164 19871102  
PRAI SU 1987-4346164 19871102  
AB SU 1546022 A UPAB: 19930928  
The extract is obt'd. by soaking the seeds in distilled  
water, subsequently removing the germ, squeezing out the  
semifluid mass of endosperm, and extraction with 5-10 ml of  
extracting solution (ethanol, isopropanol). Electrophoresis  
of the prolamines is carried out on gel discs of thickness  
1mm. The extract is applied into the start pocket in a 0.5-  
0.8 mm layer. As previously, the method involves:  
preparation of prolamine extract; electrophoretical  
separation of the prolamines in vertical discs of  
polyacrylamide gel.  
USE/ADVANTAGE - Increased accuracy in analysis of fine  
grains in the identification of the genotype of Triticeae  
perennial wheat in biotechnology, especially involving  
labelling genetic systems with proteins. Bul.8/28.2.90  
0/0

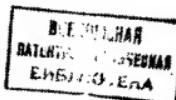


СОЮЗ СОВЕТСКИХ  
СОЦИАЛИСТИЧЕСКИХ  
РЕСПУБЛИК

(9) SU ОИ 1546022 A1

(51) 5 А 01 Н 1/04

ГОСУДАРСТВЕННЫЙ КОМИТЕТ  
ПО ИЗОБРЕТЕНИЯМ И ОТКРЫТИЯМ  
ПРИ ГННТ СССР



## ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ Н А В Т О Р С К О М У С В И Д Е Т Е Л Ъ С Т В У

(21) 4346164/31-13  
(22) 02.11.87  
(46) 28.02.90, бол. № 8  
(71) Центральный сибирский ботанический сад СО АН СССР  
(72) А.В. Агафонов и О.В. Агафонова  
(53) 575.633.112.1 (088.8)  
(56) Созинов А.А., Полиморфизм белков и его значение в генетике и селекции. М., Наука, 1985.

(54) СПОСОБ ИДЕНТИФИКАЦИИ ГЕНОТИПОВ МНОГОЛЕТНИХ ЗЛАКОВ ТРИБЫ ПШЕНИЦЕВЫЕ (TRITICAE)

(57) Изобретение относится к биотехнологии, в частности к проблеме маркирования белками генетических систем

растений и использования белковых маркеров в решении актуальных вопросов прикладной ботаники, генетики, селекции. Целью изобретения является увеличение точности анализа мелких семян многолетних кормовых злаков. Способ состоит в том, что пропламин извлекается из семян в результате замачивания зерновок в дистиллированной воде, отделения препарovalных иглами зародыша, выдавливания полужидкого эндосперма с последующей экстракцией в 5-10 мкл экстрагирующего раствора, а электрофорез осуществляется в вертикальных пластинах поликариламидного геля толщиной 1 мм, и экстракт наносится в стартовый карман слоем 0,5-0,8 мм. 1 табл.

Изобретение относится к биотехнологии, в частности к проблеме маркирования белками генетических систем растений и использования белковых маркеров в решении актуальных вопросов прикладной ботаники, генетики, селекции.

Цель изобретения - увеличение точности анализа мелких семян.

Способ осуществляется следующим образом.

Очищенные от цветочных чешуй зерновки размачивают в дистиллированной воде в течение суток. Препарovalной иглой удаляют зародыш и выдавливают полужидкую массу эндосперма с помощью тонкого стержня, прокатывая им с вершиной зерновки до ее основания. Полученный изолированный эндосперм с

массой 0,2-1 мг, отделенный от оболочки и зародыша, содержит все запасные белки без примесей, образующихся при размоле зерновки и составляющих 20-60% ее массы. Отсутствие примесей дает возможность проводить экстракцию белков в более жестких условиях в течение 12-18 ч при 40°C в 5-10 мл 70% этанола или 50% изопропанола в герметичных микропробирках. Указанная последовательность операций позволяет провести наиболее полную экстракцию пропламиновой фракции запасных белков. После центрифugирования получают 3-5 мкл концентрированного экстракта, который смешивают в соотношении 2:1 с электродным буфером электрофоретической системы, содержащим 60% сахарозы, и вторично цент-

9) SU ОИ 1546022 A1

рифицируют. Приготовленный экстракт подвергают электрофоретическому разделению в вертикальной пластине 1-миллиметрового поликарбамидного геля, при этом высокая концентрация проламинов белков в экстракте позволяет наносить в стартовый карман тонкий слой экстракта 0,5-0,8 мм. Этим достигается значительное повышение разрешающей способности электрофоретического метода. Ширина стартового кармана существенной роли не играет и может варьироваться в пределах 3-6 мм. Терmostатирование гелевой пластины в процессе электрофореза при 8-12°C позволяет повысить напряженность электрического поля до 35-37 В/см и сократить время разделения белков в пластине длиной 12 см до 2,5 ч. Способ позволяет проводить индивидуальный анализ мелких зерновок многолетних корниновых злаков с массой менее 5 мг для идентификации сортов и видов, экотипов и форм. Кроме того, появляется возможность анализировать электрофоретические спектры проламинов у гербарных образцов, собранных десятки лет назад, что становится необходимым при установлении филогенетических взаимоотношений.

Размачивание зерновок в дистилированной воде, удаление препаровальной иглы зародыша и выдавливание с помощью тонкого стержня полу жидким массы эндосперма обеспечивает анализ индивидуальных зерновок маленьких размеров. Полученный таким способом изолированный эндосперм, содержащий все запасные белки без примесей, пригоден для экстракции и дальнейших процедур, связанных с разделением белков в модифицированной электрофоретической системе.

Способ иллюстрируется следующими примерами.

**Пример 1.** Имеются семена кормового шлака пырейника новоанглийского (пырей бескорневищного) сорта "Первомайский" и образцы семян из природных популяций двух таксономических видов рода пырейник (п.шероховатостебельный и п.новоанглийский), различающихся незначительным морфологическим признаком (степень опущенности колоскового членника). Предварительный морфологический анализ сортовых семян показывает, что среди них часть следовало бы отнести к одному

виду, а часть - к другому, а также выделить ряд промежуточных форм с неясной видовой принадлежностью.

В опыте ставится задача сравнить проламиновые спектры двух таксономических видов, каждый из материала сорта "Первомайский" и из двух отдаленных мест дикого произрастания с тем, чтобы оценить правомерность разделения указанных видов на основе незначительных морфологических отличий.

Выборки зерновок из каждого указанного в таблице образца после отделения цветочных чешуй помещались в водяные камеры на 24 ч.

Кроме того, для объективного сопоставления электрофоретических спектров, полученных в серии опытов, в качестве стандартного маркера анализируются по 2 зерновки пырейника сибирского с известным компонентным составом спектра.

С размоченных зерновок удаляют избыток воды фильтровальной бумагой, пропароварильной иглой отсекают зародыш и через отверстие в оболочке выдавливают полу жидким эндосперм, протыкая с противоположного конца зерновки тонким стержнем из нержавеющей стали. Этим же стержнем изолированный эндосперм, состоящий у пырея бескорневищного 0,3-0,6 мг, помещают в полиэтиленовую микроприборку с 8 мкг 50% изопропанола, гомогенизируют, закрывают герметичной пробкой и помещают в терmostat с температурой 40°C на 12-15 ч. По истечении времени микроприборки охлаждают до комнатной температуры, взмучивают осадок тупой иглой и центрифицируют 5 мин при 12000 г. Супернатант по возможности полностью отсасывают микроприборку и смешивают в соотношении 2:1 с алюминий-лактатным буфером pH 3,1, содержащим 60% сахарозы и краситель пиорин, после чего образцы вторично центрифицируют 15 мин при 12000 г.

Для электрофоретического разделения проламинов применяют однородную гелево-буферную систему с вертикальными пластинами 1-миллиметрового 9%-ного поликарбамидного геля на алюминий-лактатном буфере pH 3,1. Одновременно анализируются 24 пробы, которые наносят под слой электродного буфера в количестве 2 мкл. Электрофорез проводят при напряжении

440 в в течение 2,5 ч, охлаждая гелевую пластину накладными оргстеклянными холодильниками с циркулирующей водой при 10-12°C. Гели фиксируют в 12%-ной трихлоруксусной кислоте (ТХУ) и окрашивают 0,1% -ным красителем Кумасси - 250 мл. в 12% ТХУ в течение 18-20 ч, не снимая со второго стекла. Окрашенные гели дифференцируют 7%-ной уксусной кислотой и фотографируют в проходящем свете.

В спектрах изученных образцов пырейника присутствует от 13 до 19 компонентов разной интенсивности. При этом около половины компонентов с определенной частотой встречается во всех изученных природных и сортовых образцах.

Ряд компонентов распределен случайным образом, независимо от морфологии колоскового членника, некоторые компоненты спектра характерны только для определенного природного экотипа.

На основании ранее установленных закономерностей распределения пропламиновых компонентов у дикорастущих злаков пшеничной трибы можно считать, что представители разных биологических видов не могут иметь в составе пропламиновых спектров идентичные со-вокупности компонентов. Таким образом, все изученные образцы пырейника следует отнести к одному виду - п.шероховатостебельный.

П р и м ер 2. Имеется партия семян многолетнего кормового злака пшеничной трибы с утерянными сортовыми свидетельствами. В состав пшеничевой трибы входит 9 родов многолетних злаков, включая важные в кормовом отношении, такие как пырей, пырейник, житняк, колосняк, ломкоколосник и т.д. Сходное строение зерновки позволяет применять описанную методику идентификации компонентов пропламина, (преобладающего запасного белка зерновки), основанную на предлагающем способе, как единую для всех

представителей трибы. Для точного определения сортовой принадлежности необходимо провести электрофоретическое разделение белкового экстракта эндосперма серии семян неизвестного образца и полученные спектры сравнить с аналогичными спектрами известных сортов.

10 Таким образом, предлагаемый способ дает возможность провести паспортизацию существующих сортов кормовых злаков трибы пшеничевые, а также контролировать все этапы селекционного процесса, апробации и районирования при создании новых хозяйственно ценных форм, значительно снизив экономические затраты на многие процедуры, позволяет достоверно анализировать природные экотипы дикорастущих пшеничных злаков, представляющих большой интерес для интродукции, а также идентифицировать гербарные образцы, содержащие семена (независимо от сроков хранения), в целях уточнения внутри- и межвидовых филогенетических связей в трибе.

#### Ф о р м у л а и з о б р е т е н и я

30 Способ идентификации генотипов многолетних злаков трибы пшеничевые (*Triticaceae*), включающий приготовление экстракта пропламинов, электрофоретическое разделение пропламинов в вертикальных пластинах поликарбонатного геля, от ли ча а ю щ и й с я тем, что, с целью увеличения точности анализа мелких семян, экстракт пропламинов готовят из изолированного эндосперма, полученного путем размачивания семян в дистиллированной воде с последующим удалением зародыша, выдавливанием полужидкой массы эндосперма и экстракцией в 5-10 мкл экстрагирующего раствора, а электрофорез пропламинов проводят на пластинах геля, толщиной 1 мм с нанесением в стартерный карман экстракта слоем 0,5-0,8 мм.

Таксономический вид	Место сбора, год	Количество зерновок	Примечание
П.шероховатостебельный	Владивосток, 1986	22	Природные популяции
П.Новоанглийский	Владивосток, 1986	22	То же
П.шероховатостебельный	Новосибирск, 1986	22	-"-
П.Новоанглийский	Новосибирск, 1986	22	-"-
П.шероховатостебельный	Получен из Омского СИБНИСХОЗа, 1987	22	Отобраны из семян пырея из бескорневищного сорта "Первомайский"
П.новоанглийский	То же	22	То же
Промежуточная форма	-"-	12	-"-

Составитель В. Демкин  
 Редактор М. Недолуженко Техред И. Сердюкова Корректор С. Черни  
 Заказ 33 Тираж 432 Подписьное  
 ВНИИПИ Государственного комитета по изобретениям и открытиям при ГКНТ СССР  
 113035, Москва, Ж-35, Раушская наб., д. 4/5  
 Производственно-издательский комбинат "Патент", г. Ужгород, ул. Гагарина, 101